

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Juli 2001 (05.07.2001)

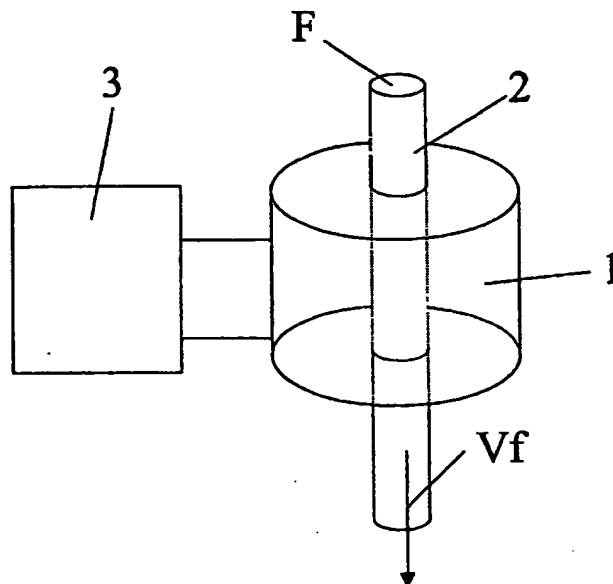
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/48181 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): UEBERLE, Friedrich
[DE/DE]; Martin-Luther Weg 15, 82205 Gilching (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04631 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, CN, JP, RU, SG,
US.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Dezember 2000 (23.12.2000) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 62 904.8 23. Dezember 1999 (23.12.1999) DE
100 63 942.9 20. Dezember 2000 (20.12.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): DORNIER MEDIZINTECHNIK GMBH
[DE/DE]; Argelsrieder Feld 7, 82234 Wessling (DE).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR TRANSFERRING MOLECULES INTO CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM TRANSFER VON MOLEKÜLEN IN ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a medium in which cells and molecules to be transferred into these cells are located. Said medium is moved inside a hollow cylindrical device, which generates acoustic pulses that induce cavitation, in relation to an area in which the acoustic pulses occur in a focussed manner.

(57) Zusammenfassung: Ein Medium, in welchem sich Zellen und in diese Zellen zu transferierende Moleküle befinden, wird innerhalb einer hohlzylindrischen Vorrichtung zum Erzeugen akustischer, Kavitation bewirkender Pulse relativ zu einem Bereich, in dem die akustischen Pulse fokussiert auftreten, bewegt.

WO 01/48181 A2

BEST AVAILABLE COPY

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung gemäß Oberbegriff von Anspruch 1

5 Aus der deutschen Anmeldung 19834612.3-41 ist eine Vorrichtung und ein Verfahren bekannt, bei welchem der intrazelluläre Transfer von Oligonukleotiden unter dem Einfluss von Stoßwellen beschrieben ist. Bei der dort beschriebenen Erfindung wird jeweils ein Probenbehälter mit den zu transferierenden Molekülen und den Zielzellen in eine Art Wasserbad gesetzt und einer vorgegebenen Anzahl von Stoßwellen ausgesetzt. Die Moleküle
10 und die Zielzellen befinden sich in einem Medium, welches Schallwellen leitet und in welchem die Vitalfunktionen der Zielzellen erhalten bleiben. Diese Stoßwellen erzeugen eine sogenannte Kavitation, welche die Zielzellen transient permeabel für die zu transferierenden Moleküle macht.

15 Anschließend wird der Probenbehälter gewechselt. Dies hat den Nachteil, dass relativ aufwendig die zu transferierenden Moleküle und die Zielzellen in den Probenbehälter und dieser dann in das Wasserbad gebracht werden muss. Dies resultiert in einer mengenmäßigen Begrenzung der mit Molekülen dotierten Zielzellen, was den bekannten Stand der Technik für einen kommerziellen Einsatz etwa in der Pharmaindustrie ungeeignet macht.

20 Aus der DE 3821354 ist es bekannt, in größeren Volumina Kavitation zu erzeugen. Dort wird eine sogenannte Sonotrode als Erzeuger der Kavitation verwendet. Aus dieser Schrift ist jedoch auch bekannt, dass selbst Hochleistungs-sonotroden alleine keine großen Volumina effizient mit kurzzeitiger Kavitation versorgen können, daher werden dort in die Suspension
25 zusätzliche Aktivoren eingebracht, die ihrerseits in Resonanz gebracht werden und dann im Resonanzzustand Kavitation in ihrer Umgebung erzeugen. Nachteilig ist hier, dass diese Aktivoren wieder aus der Suspension entfernt werden müssen.

Ferner ist es aus der WO 99/58637 bekannt, in einem Volumen Arrays aus Piezowandlern
30 Kavitation zu erzeugen. Mit phasenverschoben angesteuerten werden steuerbare, konstruktive und destruktive Schallinterferenzen erzeugt mit dem Ziel, an Orten von Interferenzmaximas eine Art Fokussierung zu erreichen. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass der so erzeugte

Fokusbereich nur geringe Volumina umfasst und der technische Aufwand für die Ansteuerung und Regelung der Piezowandler Arrays der sehr hoch ist.

- 5 Um einerseits eine Transfektion zu bewirken und andererseits so wenig Zellen wie möglich zu zerstören hat es sich überraschenderweise als besonders vorteilhaft herausgestellt, wenn die Schallpulse nur sehr kurzzeitig wirken, dabei aber die Kavitationsschwelle der Flüssigkeit überschreiten.

- 10 Bei bekannten Vorrichtungen zum Erzeugen solcher, Kavitation erzeugender Schallpulse die mit den sogenannten Sonotroden arbeiten, besteht der gravierende Nachteil, dass die Sonotroden zunächst in Resonanz gebracht werden müssen, um Schwingungen zu erzeugen, die eine so hohe Amplitude zu aufweisen, welche die Kavitationsschwelle überschreitet. Somit sind in nachteiliger Weise keine Einzelimpulse möglich. Dies hat ebenfalls nachteilig zur Folge, dass eine zu hohe "Dosis" von Kavitationsereignissen auf die Zellen einwirken und dadurch die
15 Zellen zerstört werden.

Die herkömmliche Ausgestaltung der Beschallungseinrichtung mit Sonotroden fördert zudem Schaum- und Aerosolbildung, wodurch die Reproduzierbarkeit der Beschallungsergebnisse herabgesetzt ist.

20

Bei dem aus der WO 99/58637 bekannten Vorrichtung, mit phasenverschoben angesteuerten Arrays aus Piezowandlern ändert sich der Fokus sobald Kavitation auftritt, wodurch sich der Fokusbereich sich nur stochastisch vorhersagen läßt.

- 25 Es ist daher Aufgabe der Erfindung eine Vorrichtung zu schaffen, womit Moleküle in Zielzellen transferiert werden können und dabei die Nachteile des Standes der Technik überwunden werden und insbesondere eine rationelle mengenmäßig stark erhöhte Produktion ermöglicht wird.

- 30 Es ist Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zu schaffen, mit welcher Kavitation erzeugt werden kann, die einerseits ausreicht, um Zellen transient permeabel für Moleküle zu machen, andererseits aber nur so kurz andauert, dass die Zellen im wesentlichen nicht nachhaltig

geschädigt werden und insbesondere eine rationelle mengenmäßig stark erhöhte Produktion ermöglicht wird.

Diese Aufgabe wird erfüllt durch die kennzeichnenden Merkmale der jeweiligen

5 Hauptansprüche.

Die jeweiligen Unteransprüche betreffen Weiterbildungen und/oder besonders vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.

- 10 Die Überlegungen, die zur Entstehung der Erfindung führten machten sich die Erkenntnis zu eigen, dass eine hohlzylindrische Vorrichtung, in die radial von Außen eine Vielzahl von gleichphasigen Schallimpulsen eingeleitet wird im Bereich um die Rotationsachse des Hohlzylinders eine reproduzierbare Zone transienter Kavitationsereignisse erzeugt.
- 15 Die Überlegungen, die zur Entstehung der Erfindung führten, gingen davon aus, dass es für den Transfer der Moleküle in die Zielzellen unerheblich ist, wie groß die gesamte Menge des Mediums ist, in dem sich die zu transferierenden Moleküle und Zielzellen befinden, sofern jeweils Teile aus der Gesamtmenge nacheinander in den Wirkungsbereich der akustischen Pulsen gelangen und so die darin enthaltenen Zielzellen einer Behandlung ausgesetzt werden.
- 20 Um ein im Verhältnis zum Wirkungsbereich der fokussierten akustischen Pulse großes Volumen dieses Mediums zu behandeln, ist es erfindungsgemäß vorgesehen, dass zwischen der Quelle der fokussierten akustischen Pulse und dem zu behandelnden Medium eine Relativbewegung stattfindet, wodurch stets neue zuvor noch nicht mit fokussierten akustischen Pulsen behandelte Bereiche des Mediums behandelt werden.
- 25 Diese Relativbewegung kann nun durch Bewegen der Quelle relativ zu einem feststehenden Flüssigkeitsbehälter oder durch Bewegen des Flüssigkeitsbehälters relativ zu einer feststehenden Quelle erfolgen.
- 30 Entsprechend kann sich erfindungsgemäß das Medium mit den Zielzellen und den zu transferierenden Molekülen auch durch ein Leitungssystem bewegen, während es sich im Einfluss der fokussierten akustischen Pulse befindet.

- Generell muss eine der räumlichen Ausdehnung des Wirkbereiches der akustischen Pulse und der Wiederholfrequenz der akustischen Pulse angepasste Relativgeschwindigkeit zwischen dem Medium und der Quelle akustischer Pulse herrschen. Die Parameter müssen so aufeinander abgestimmt sein, dass die Zielzellen bei ihrer Bewegung durch das Leitungssystem mindestens
- 5 der vorgegebenen Anzahl von Pulsen ausgesetzt sind.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines möglichen Ausführungsbeispiels näher erläutert.

- Die Figur 1 zeigt ein mögliches Ausführungsbeispiel der Erfindung. Mittels einer im
- 10 wesentlichen hohlzylinderförmigen Quelle 1 werden akustische Pulse erzeugt, durch welche eine rohrförmige Leitung 2 geführt ist. In dieser Leitung 2 befindet sich das Medium. Im gezeichneten Fall handelt es sich um eine Flüssigkeit F, welche eine Viskosität aufweist, die ein Fließen durch die Leitung 2 ermöglicht.

- 15 Die Quelle 1 ist so beschaffen, dass sie die akustischen Pulse in ihrem Inneren und somit in dem Bereich, in welchem die Leitung 2 verläuft fokussiert. Der Fokus verläuft hierbei im wesentlichen axial. Der Bereich des Fokus ist der sogenannte Wirkbereich der akustischen Pulse daher wird im folgenden Fokusbereich genannt.. Die Quelle 1 ist im gezeigten Beispiel rotationssymmetrisch zylindrisch gestaltet. Die Wandung der Leitung 2 ist zumindest im Bereich
- 20 des Fokus für akustische Pulse durchlässig. Zwischen der Quelle 1 und der Leitung 2 befindet sich ein geeignetes Koppelmedium, das die akustischen Pulse von der Quelle 1 auf die Leitung 2 überträgt.

- Als Erregungsprinzip für die akustischen Pulse ist es vorgesehen, eine Vielzahl von
- 25 Piezoelementen zu verwenden, die alle konzentrisch in Richtung der Rotationsachse gerichtet sind und zeitgleich, gleichphasig angeregt werden. Auf diese Weise ist es möglich einen langgestreckten Fokusbereich zu erzeugen.

- Auch ist es möglich die zylindrische Quelle anstatt aus einer Vielzahl von konzentrisch auf die
- 30 Rotationsachse ausgerichteten Piezoelementen durch eine Vielzahl von nebeneinanderliegenden Piezoringen realisieren, deren Mittelpunkt auf der Rotationsachse liegen.

Ebenso ist es auch möglich als Aktoren zur Erzeugung der akustischen Pulse magnetostruktive Elemente zu verwenden.

5 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sieht vor, die Quelle 1 als Hohlkörper mit halbkreisförmigem Querschnitt als einen mehr rinnenförmigen Körper auszubilden. Bei diesen Ausführungsformen ergibt sich ein Fokusbereich, der sich etwa über die Länge der Quelle erstreckt. Durch diesen langgestreckten Fokusbereich verläuft die Leitung, in der sich die Flüssigkeit F befindet. Dies hat den Vorteil, dass die Quelle an eine bestehende Leitung angekoppelt werden kann und nicht zuerst die Leitung durch die hohlzylindrische Quelle 1
10 hindurch verlegt werden muss.

Auch ist es möglich, in der hohlzylindrischen Quelle einen Spalt vorzusehen, durch den die Leitung in das Innere des hohlzylindrischen Körpers gebracht werden kann. Auch bei dieser Ausführungsform kann die Quelle in vorteilhafter Weise an eine bestehende Leitung
15 angekoppelt werden.

Die Ausführung einer Quelle 1 gemäß der Figur 2 mit halbkreisförmigem Querschnitt bietet den Vorteil, dass die Quelle von der Seite her leicht an eine Leitung angesetzt werden kann, ohne die Leitung durch das Innere der Quelle verlegt werden muß.

20

Auch ist es möglich den Hohlkörper teilbar auszugestalten und dann von beiden Seiten her um die Leitung zu legen.

Auch ist es möglich, als Quelle der akustischen Pulse einen explodierenden Draht einzusetzen, wobei dieser Draht entlang der Brennnlinie eines elliptisch oder parabol geformten Hohlrohres gespannt ist.

25

Ebenso kann für die Erregung auch eine Spule verwendet werden, die auf eine sich innerhalb der Spule befindliche Membran einwirkt und so einen nach innen gerichteten akustischen Puls
30 erzeugt.

Durch die Quelle 1 werden akustische Pulse auf die Flüssigkeit F abgestrahlt und erzeugen dort kurzzeitig Bedingungen (Druck bzw. Unterdruck mit ausreichender Intensität, Kavitation), um einen Transfer der Moleküle in die Zielzellen zu bewerkstelligen.

5 Es hat sich gezeigt, dass innerhalb weiter Druck bzw. Unterdruckbereiche ein Transfer der Moleküle in die Zellen möglich wird. Die Druckbereiche liegen hierbei zwischen 10 Mpa und 150 Mpa. Die Unterdruckbereiche liegen bei -5 Mpa bis -50 Mpa. Die Intensität liegt zwischen 0,5 mJ/mm² und 5,0 mJ/mm².

10 Zudem hat sich gezeigt, dass eine längere Dauer der Kavitationsereignisse nicht dazu beiträgt, dass die Transfektionsrate ansteigt, sondern vielmehr nachteilig mit zunehmender Dauer der Kavitationsereignisse die Schädigung der Zellen zunimmt.

Daher wird mit der erfindungsgemäßen Quelle nur ein kurzzeitiges Kavitationsereignis erzeugt.

15

Durch eine aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeichnete Pumpe kann die Fließgeschwindigkeit V_f der Flüssigkeit F veränderbar sein.

Die Quelle 1 wird von einer Einheit 3 pulsformig angeregt. Beim Durchströmen der Leitung 2
20 werden die Zielzellen und die zu transferierenden Moleküle einer vorbestimmten Anzahl von akustischen Pulsen einer vorbestimmten Intensität ausgesetzt.

Durch die strömungs- und kavitationsbedingten Verwirbelungen innerhalb der Leitung 2 geraten beim Durchströmen der Quelle stochastisch gesehen alle Zellen der Suspension
25 genügend oft in den Wirkungsbereich der kurzzeitigen Kavitation und werden hierdurch transient permeabel.

Ebenso ist es auch möglich, die Flüssigkeit F pulsierend oder auch getaktet durch die Leitung 2 fließen zu lassen. Hierbei wird die Flüssigkeit F immer so gefördert, dass jeweils der Bereich,
30 der gerade vor der Quelle 1 in der Leitung stand, so weit weitergefördert wird, dass dieser dann etwa am Ende der Quelle 1 zu stehen kommt. Während sich der Flüssigkeitsbereich innerhalb der Quelle 1 im Fokus der akustischen Pulse befindet, wird eine vorgegebene Anzahl

von akustischen Pulsen abgegeben, durch welche der Transfer von Molekülen in die Zielzellen angeregt wird.

Die akustischen Pulse, die auf die Flüssigkeit oder allgemein formuliert auf das Medium
5 einwirken, können aus Ultraschall Impulsen oder aus einer oder mehrerer aufeinanderfolgenden Stoßwellen bestehen.

Es hat sich gezeigt, dass der Transfer der Moleküle in die Zellen von der Anzahl der
Ultraschall Impulse bzw. Stoßwellen abhängt. Bei einer höheren Anzahl von Ultraschall
10 Impulsen bzw. Stoßwellen steigt die Transfektionsrate. Ebenso nimmt die Zahl der durch die Behandlung geschädigten Zellen mit der Anzahl der Ultraschall Impulse bzw. Stoßwellen zu.

Auch die Intensität (Masseinheit mJ/mm^2) der Ultraschall Impulse bzw. Stoßwellen hat einen
Einfluß sowohl auf die Anzahl der intrazellulär transferierten Moleküle als auch auf die
15 Schädigung der Zellen. Mit steigender Intensität ergibt sich sowohl für die Anzahl der intrazellulär transferierten Moleküle als auch der geschädigten Zelle eine Zunahme.

Analog zu der beschriebenen Bewegung des Mediums durch die Leitung ist es auch möglich,
die erfindungsgemäße Relativbewegung zwischen der Quelle akustischer Pulse und dem
20 Medium in welchem sich die Moleküle und die Zielzellen befinden durch eine Bewegung eines Behälters, in dem sich das Medium befindet, zu realisieren. Die Quelle der akustischen Pulse steht hierbei fest und der Behälter wird bewegt.

Der Behälter kann hierbei beliebig geformt sein, entscheidend ist jedoch, dass die Bewegung
25 des Behälters so erfolgt, dass nacheinander das gesamte Volumen des Behälters in den Wirkbereich der akustischen Pulse gelangt ist.

Auch ist es möglich, den Behälter an einem sterilen Ort zu befüllen und zu versiegeln und
anschließend diesen Behälter in einem "Nichtsteril- Bereich" mit den akustischen Impulsen zu
30 behandeln.

Ebenso ist es auch möglich, den Behälter feststehend auszubilden und eine oder auch mehrere Quellen akustischer Pulse so zu bewegen, dass nacheinander das gesamte Volumen des Behälters in den Wirkungsbereich der akustischen Pulse gelangt.

- 5 Sämtliche Bewegungen von Medium relativ zur Quelle akustischer Pulse können kontinuierlich oder auch getaktet ablaufen.

In einer Weiterbildung der Erfindung ist es vorgesehen, die zu transferierenden Moleküle erst unmittelbar vor dem Fokusbereich dem Medium zuzuführen, in welchem sich die Zielzellen
10 befinden.

Ein besonders vorteilhafter konstruktiver Aufbau der Quelle ist in den Figuren 3 und 4 gezeigt.

Die Quelle gezeigt in Figur 3 besteht aus einem inneren Ring 3, der in seinem inneren Freiraum
15 7 die hier nicht gezeigte Leitung oder ein Probenröhrchen aufnehmen kann.

Um den Außenumfang des inneren Ringes 3 sind Piezoelemente 4 verteilt angeordnet. In dieser Darstellung sind aus Gründen der Übersicht nur einige dieser Piezoelemente 4 gezeichnet.

20 Durch einen weiteren Ring 6 werden die Piezoelemente 4 an ihrer, dem inneren Ring 3 abgewandten Seite gehalten. Der äussere Ring 6 ist als Spannring ausgebildet. Sein Innendurchmesser lässt sich über eine Spannschraube 2 verändern. Hierbei verändert sich auch der Spalt 1.

25 Auf diese Weise können die Piezoelemente 4 fest zwischen den inneren Ring 3 und den äusseren Spannring 6 eingeklemmt werden. Hierdurch ist ein guter Schallübergang zwischen den Piezoelementen 4 und den Ringen 4 und 6 gewährleistet.

Die Figur 4 zeigt eine weitere Version der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Dort sind die
30 Piezoelemente 4 in der aus Fig 3 bekannten Weise um den inneren Ring 3 angeordnet. An ihrer, dem inneren Ring 3 abgewandten Seite liegt ein Zwischenring 8 an. Auf diesem Zwischenring 8 sind wiederum Piezoelemente 7 angeordnet. Auf diese Piezoelemente 7 folgt der schon aus Fig 3 bekannte Spannring 6.

Vorrichtung zum Transfer von Molekülen in Zellen

- 5 1.. Vorrichtung zum Transfer von Molekülen in Zellen, wobei
ein Medium (F), in dem sich die zu transferierenden Moleküle und die Zielzellen befinden im
Fokusbereich einer Quelle akustischer Impulse diesen akustischen Pulsen aussetzbar ist,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Quelle einen zumindest annähernd linienförmigen Fokusbereich aufweist, in welchem die
10 akustischen Pulse einen vorgegebenen Druck oder Unterdruck und/oder eine vorgegebene
Intensität überschreiten und
eine Vorrichtung vorgesehen ist, durch welche eine Relativbewegung zwischen dem Medium
(F) und dem Fokusbereich ausgeführt wird.
- 15 2.. Vorrichtung nach Anspruch 1
dadurch gekennzeichnet, dass
eine Leitung (2) vorgesehen ist, durch welche das Medium (F) transportierbar ist und die
Leitung durch den Fokusbereich der Quelle (1) geführt ist.
- 20 3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Quelle (1) als im wesentlichen hohlzylindrischer Körper ausgebildet ist und der
Fokusbereich entlang der Mittelachse des hohlzylindrischen Körpers verläuft.
- 25 4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Quelle (1) akustischer Pulse als ein Körper mit halbkreisförmigen Querschnitt ausgebildet
ist und der Fokusbereich entlang der Mittellinie des Halbkreises verläuft.
- 30 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4
dadurch gekennzeichnet, dass
die Quelle (1) eine Vielzahl von Piezo Elementen umfasst, die zeit- und phasengleich erregbar
sind.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5
dadurch gekennzeichnet, dass
die Quelle (1) aus einer Vielzahl von nebeneinanderliegenden Piezoringen besteht.
- 5
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6
dadurch gekennzeichnet, dass
ein Zugang zu der Leitung (2) vorgesehen ist, durch welchen die zu transferierenden Moleküle
dem Medium (F), in welchem sich die Zielzellen befinden, zuführbar sind.
- 10
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7
dadurch gekennzeichnet, dass
eine Vielzahl von Schallwandlern auf einem gemeinsamen Träger aufgebracht ist und ein
mechanisches Element (6) die Schallwandler (4) an den Träger (3) drückt.
- 15
9. Vorrichtung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass
das mechanische Element (6) die Schallwandler (4) an der Seite berührt, die dem Träger (3)
abgewandten Seite berührt.
- 20
9. Vorrichtung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass
das mechanische Element (6) in Form eines Spannrings ausgebildet ist.
- 25
10. Vorrichtung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Träger (3) und das mechanische Element (6) ringförmig aufgebaut sind.
- 30
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 10
dadurch gekennzeichnet, dass
die Schallwandler in mehreren Lagen, mit unterschiedlichem Abstand zum Träger (3)
angeordnet sind.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet, dass

die unterschiedlichen Lagen von Schallwandlern durch Trennlagen separiert sind.

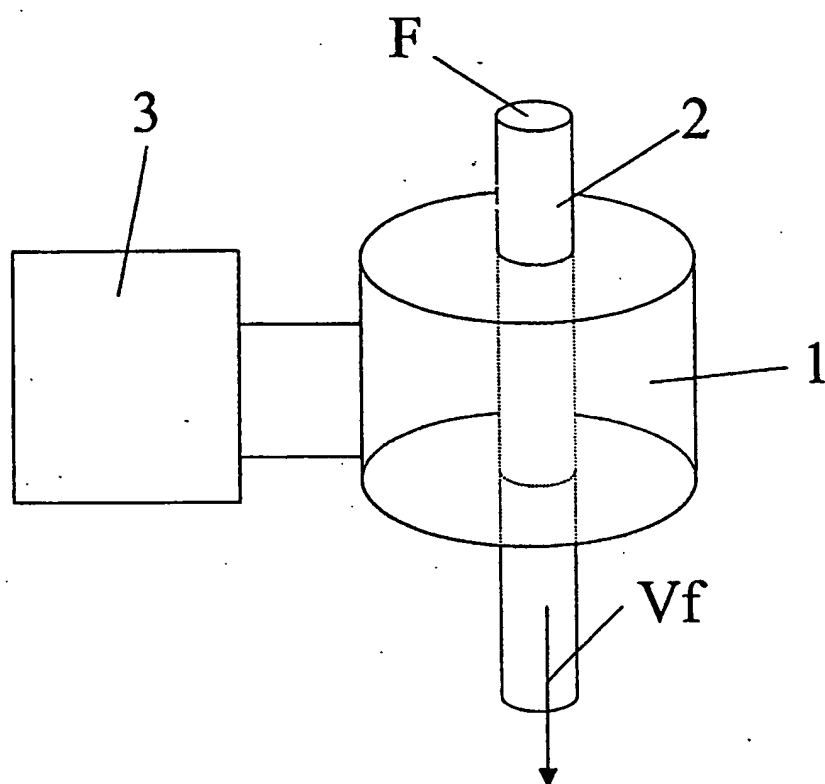


Fig. 1

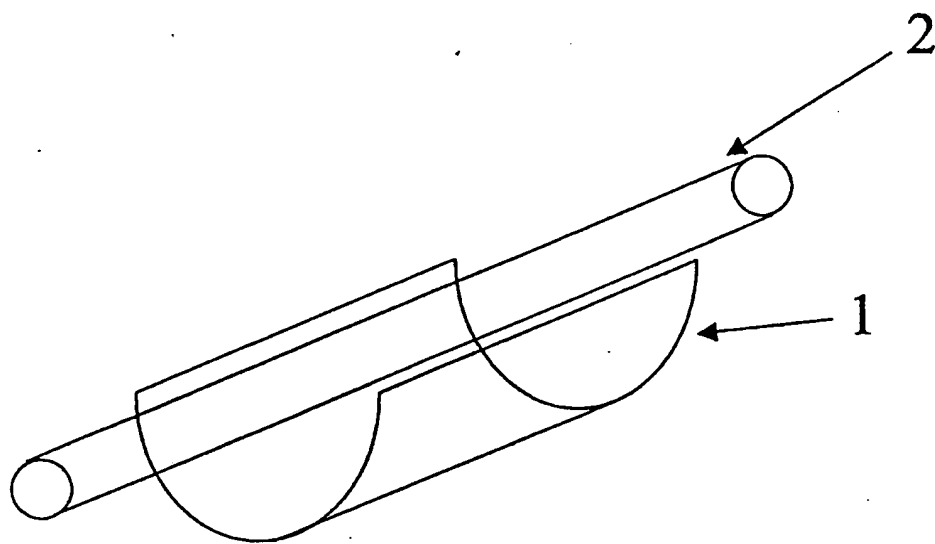


Fig.2

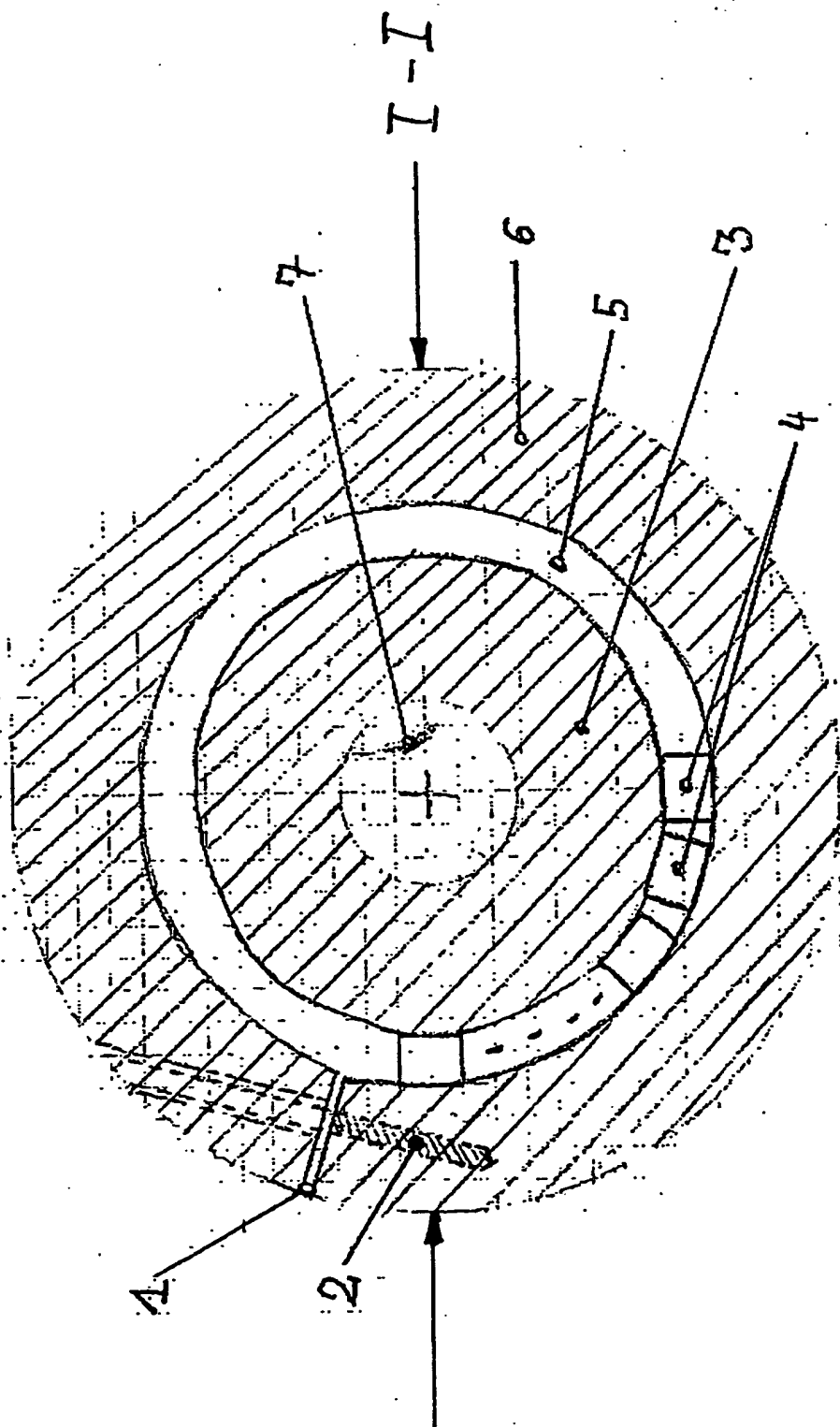


Fig 3

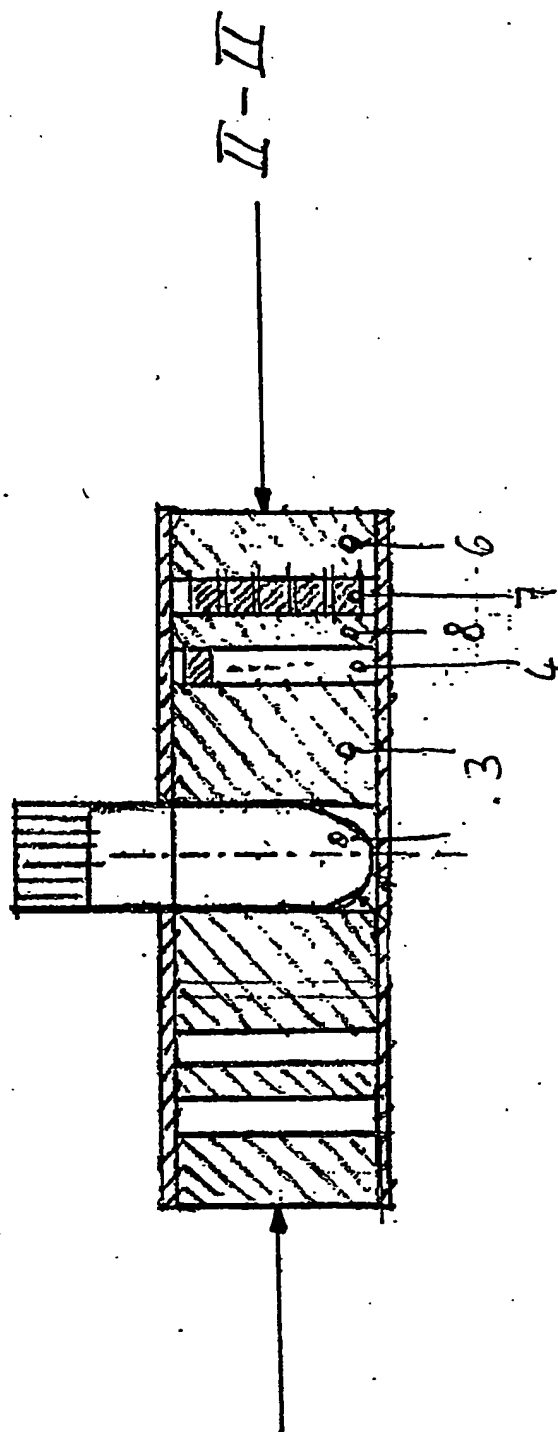


Fig 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.